

УДК 577.15

ОЧИСТКА И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ АКОНИТАТГИДРАТАЗЫ ИЗ ГЕПАТОЦИТОВ ГОЛОДАЮЩИХ КРЫС

© 2001 г. А.Т. Епринцев, Е.В. Семенова, В.Н. Попов

Воронежский государственный университет

Обнаружена индукция активности аконитатгидратазы в гепатоцитах крыс в условиях пищевой депривации. С помощью пятистадийной очистки был получен электрофоретически гомогенный препарат цитоплазматической аконитазы с R_f 0,7. Определена молекулярная масса фермента, изучены его некоторые физико-химические свойства, а также разработаны условия длительного хранения ферментного препарата.

В экспериментальных и патологических состояниях, к которым можно отнести и голодание, наблюдается мобилизация всех внутренних резервов, активирующих защитные реакции организма. В последнее время особый интерес представляет выяснение особенностей координации липидного и углеводного метаболизма в тканях животных, а также изучение ситуаций, в которых активные глюконеогенетические процессы протекают за счет мобилизации запасных жирных кислот. Известно, что при голодании в гепатоцитах различных тканей животных и человека накапливается гликоген [1]. Но, т.к. эта патология характеризуется сокращением поступления глюкозы в клетки из крови, образование внутриклеточного гликогена может происходить преимущественно путем глюконеогенеза [2]. Причем, переход промежуточных продуктов распада жирных кислот на путь биосинтеза гликогена возможен через, так называемый, глиоксилатный цикл. Наличие ферментов β -окисления жирных кислот в специфических органеллах, получивших название глиоксисом, позволяет предположить возможность индукции ферментов глиоксилатного цикла. За счет последних и обеспечивается интенсивное протекание глюконеогенеза. Выяснение роли глиоксилатного цикла в эффективной связи процессов β -окисления жирных кислот и биосинтеза углеводов играет важное значение для понимания механизма патологии и поиска способов профилактики и лечения многих заболеваний обменно-характера [3].

Считается, что немаловажную роль в обеспечении интенсивного протекания глюконеогенеза в условиях стресса играет аконитатгидратаза (аконитаза, АГ, КФ 4.2.1.3), катализирующая реакции взаимопревращения цитрата, цис-аконитата и изоцитрата, обеспечивая тем самым функционирование таких важных физиологических процессов в клетке, как цикла трикарбоновых кис-

лот и глиоксилатного цикла. Многими авторами показано вероятное существование двух изоферментных форм аконитатгидратазы в цитоплазме и глиоксисомах, с одной стороны, и в митохондриях – с другой [4, 5].

Ранее было установлено, что в животных клетках под влиянием стрессовых факторов наблюдается индукция ферментов глиоксилатного цикла, таких как изоцитратлиаза и малатсинтаза [6, 7].

Поэтому, целью данной работы было выделить и очистить изоформы АГ из гепатоцитов крыс в условиях пищевой депривации, а также изучить их некоторые физико-химические и регуляторные свойства.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования использовали лабораторных крыс (*Rattus rattus* L.), выращенных при нормальном питании в возрасте двух-трех месяцев, массой 150-300 г, которых помещали в условия пищевой депривации при свободном доступе к воде на срок до 6 суток. Контролем служили животные, содержащиеся при обычном рационе вивария.

Для извлечения печени животных предварительно усыпляли диэтиловым эфиром и проводили декапитацию. Выделение субклеточной фракции производили гомогенизацией 1 г печени в 5 мл среды выделения, содержащей 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 0,5 М сахарозы, 5 мМ цитрат Na, 1 мМ MgCl₂, 4 мМ дитиотрейтол (ДТТ) и 1 мМ ЭДТА, осаждение не разрушенных тканей осуществляли центрифугированием при 3000g в течение 10 мин.

Определение активности АГ проводили спектрофотометрически при 240 нм по разнице поглощения цитрата и изоцитрата по сравнению с цис-аконитовой кислотой. Среда колориметрирования содержала: 50 мМ Tris-HCl-буфер, pH 8,0; 2 мМ изоцитрат Na и 1 мМ MgCl₂, 1 мМ ДТТ. За единицу фермента-

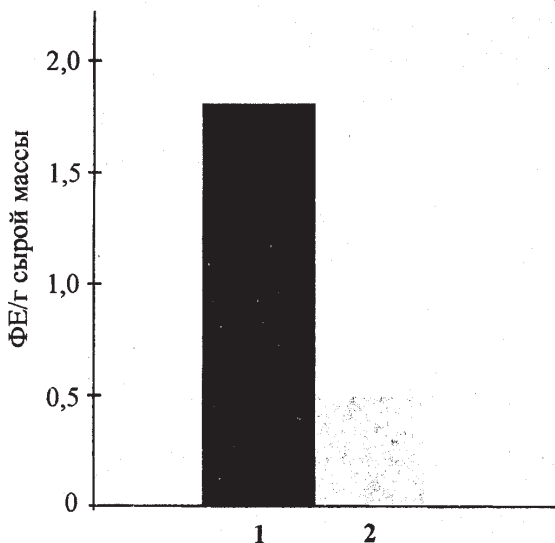


Рис. 1. Индукция активности цитоплазматической аконитатгидратазы в гепатоцитах крыс в условиях пищевой депривации. Обозначения: 1 – опыт; 2 – контроль

тивной активности (ФЕ) принимали количество фермента, превращающее 1 мкМ субстрата за минуту при 25°C и оптимальном значении pH. Содержание белка в пробе определяли по методу Лоури.

В ходе исследований применяли метод диск-электрофореза в полиакриламидном геле. Универсальное окрашивание белков в гелях осуществляли амидом черным 10В, для специфической идентификации АГ нами использовалась среда проявления следующего состава: 50мМ Tris-HCl буфер, pH 8,0, 20мМ цис-аконитовая кислота, 2 мМ MgCl₂, 1 ФЕ NADP-зависимой изокитратдегидрогеназы (ИДГ), 1мМ NADP⁺, 3,3мМ феназинметосульфат (PMS), 0,5мг на 1 мл нитросинего тетразолия (NTB) [8, 9].

Очистку фермента осуществляли по следующей схеме:

1. фракционирование сульфатом аммония (35–65% насыщения);
2. обессоливание полученного белкового препарата с помощью гель-фильтрации. Колонку с сефадексом G-25 («Pharmacia», Швеция) (1,7×15 см) уравнивали 50 мМ Tris-HCl-буфером, pH 8,0;
3. ионообменная хроматография на ДЭАЭ-ТОУОРЕАРЛ (ДЭАЭ-Fraktogel). Белковую фракцию наносили на колонку (1,5×13 см), уравниваемую 10 мМ Tris-HCl-буфером, pH 8,0. Элюцию производили ступенчатым градиентом KCl;
4. гель-фильтрация на колонке с ТОУОРЕАРЛ HW-65 («Toyosoda», Япония) (2,0×55 см), уравниваемой 50 мМ Tris-HCl-буфером, pH 8,0, содержащей 150мМ NaCl. Все операции проводили в холодной комнате при 0-4°C.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У опытных животных, подвергшихся воздействию пищевой депривации, наблюдается увеличение в 3-3,5 раза активности цитоплазматической изоформы в условиях пищевой депривации (рис. 1). К 4-5 дню голодания это значение было максимальным и составляло для гомогената тканей печени 2,7 ФЕ/г сырой массы. К 6 дню активность фермента снижалась, и эксперимент прекращали (рис. 2).

Для изучения физико-химических свойств цитоплазматической АГ в гепатоцитах крыс нами была проведена очистка данной формы фермента, результаты которой представлены в табл. 1 и 2. При фракционировании сульфатом аммония и гель-фильтрации на сефадексе G-25 в опытах был обнаружен один пик аконитазной активности. Элюцию препаратов фермента с ДЭАЭ-ТОУОРЕАРЛ после двухстадий-

Таблица 1.

Очистка цитоплазматической аконитатгидратазы из гепатоцитов голодающих крыс

Стадии очистки	Объем, мл	Общая активность, ФЕ	Количество белка, мг	Удельная активность, ФЕ/мг белка	Степень очистки	Выход, %
Гомогенат	30,5	11,5	238,200	0,048	(1)	(100)
Фракционирование (NH ₄) ₂ SO ₄ , 35-65%	5,0	8,5	82,520	0,103	2,2	74
Гель-фильтрация на сефадексе G-25	8,0	6,1	30,960	0,197	4,1	53
Хроматография на ДЭАЭ-Тоуорpearl	9,5	2,9	0,720	4,028	84,0	25
Гель-фильтрация на Тоуорpearl HW-65	6,0	1,1	0,099	11,110	231,5	10

Таблица 2.

Очистка цитоплазматической аконитатгидратазы из гепатоцитов контрольных крыс

Стадии очистки	Объем, мл	Общая активность, ФЕ	Количество белка, мг	Удельная активность, ФЕ/мг белка	Степень очистки	Выход, %
Гомогенат	29,0	3,27	240,0	0,014	(1)	(100)
Фракционирование (NH ₄) ₂ SO ₄ , 35-65%	5,6	1,60	64,0	0,025	1,8	49
Гель-фильтрация на сефадексе G-25	11,5	0,95	28,1	0,034	2,4	29
Хроматография на ДЭАЭ- Toyopearl	8,0	0,36	0,53	0,679	48,5	11
Гель-фильтрация на Toyopearl HW-65	5,5	0,17	0,106	1,604	114,6	5

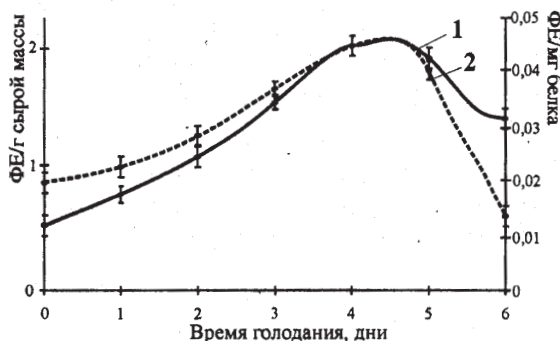


Рис. 2. Изменение аконитазной активности в гепатоцитах крыс при голодании

Обозначения:

- 1 - активность, ФЕ/г сырой массы;
2 - активность, ФЕ/мг белка

ной очистки производили ступенчатым градиентом KCl. Активность была обнаружена во фракции, содержащей 60 мМ KCl. Для получения гомогенного препарата сконцентрированные активные фракции белка наносили на колонку с TOYOPEARL HW-65. Последовательное применение указанных стадий позволило получить цитоплазматическую форму фермента в условиях пищевой депривации с удельной активностью 11,1 ФЕ/мг белка, что соответствует очистке в 231,5 раз и выходу – 10% и в норме с удельной активностью 0,6 ФЕ/мг белка, очисткой в 114,6 раз и выходом – 5%.

Электрофоретические исследования полученных препаратов цитоплазматической изоформы в полиакриламидном геле показали наличие на электрофореграммах одной белковой полосы с R_f 0,7, как в норме, так и при голодании. С помощью специфического проявления на активность нами было определено, что полученный электрофоретически гомогенный препарат фермента соответствует аконитазной активности

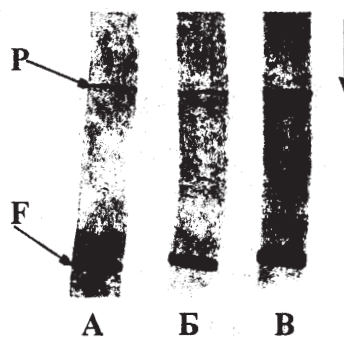


Рис. 3. Электрофореграмма цитоплазматической аконитатгидратазы в гепатоцитах крыс

Обозначения: А – универсальное окрашивание амидом черным 10В проб в контроле; Б – универсальное окрашивание амидом черным 10В проб в опыте; В – специфическое проявление; Р – белковая полоса; F – фронт красителя бромфенолового синего. Стрелка указывает направление движения белка при электрофорезе

(рис. 3). Значение молекулярной массы, определенное гель-фильтрацией на сефадексе G-150 и TOYOPEARL HW-65 (с помощью калибровочных кривых маркерными белками) представлены в табл. 3.

При изучении физико-химических свойств аконитазы было установлено, что фермент подчиняется кинетике Михаэлиса-Ментен. K_m по цитрату, изоцитрату и цис-аконитату предложены в табл. 3. Анализ полученных данных показывает, что наибольшее сродство цитоплазматическая изоформа имели к цис-аконитату: \approx в 2 раза больше, чем к изоцитрату и \approx в 20 раз выше, чем к цитрату. Для изучения pH-оптимума использовались буферные системы: Tris-HCl, NaH₂PO₄-Na₂HPO₄. Наибольшую активность АГ проявляла в интервале pH 6,8-8,0 (табл. 3).

В ходе исследований нами были разработаны условия длительного хранения препаратов фермента. Актив-

Таблица 3.

Некоторые физико-химические и каталитические свойства цитоплазматической изоформы аконитатгидратазы из гепатоцитов крыс

Условия эксперимента	K _m , мМх10 ⁻²			Оптимум pH		Молекулярная масса, кДа
	Цитрат	Изоцитрат	Цисаконитат	Tris-HCl буфер	Натрий-фосфатный буфер	
Контроль	8,25	1,14	0,46	8,0	7,4	91
Опыт	9,30	1,47	0,62	8,0	7,2	94

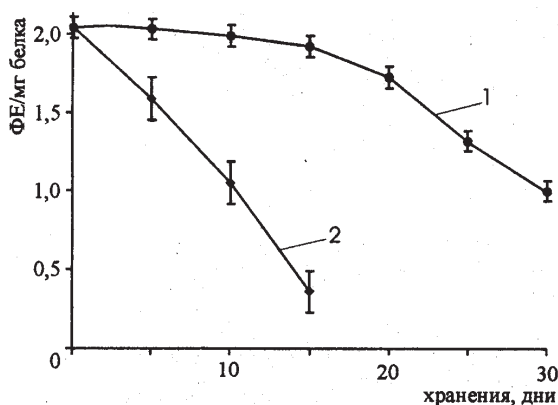


Рис. 4. Влияние условий хранения на активность аконитатгидратазы из гепатоцитов крыс

Обозначения:

1 — длительное хранение; 2 — обычные условия

ность высокоочищенной аконитазы при хранении препарата при 4°С снижалась за первые сутки на 20-30%, а в дальнейшем примерно на 3-5% каждые сутки. Оптимальными для АГ являются следующие условия: среда, содержащая 0,1 М Tris-HCl буфер, pH 8,0; 2 мМ β-меркаптоэтанол или 8 мМ дитиотрейтол; 4 мМ MgCl₂; 25% глицерин и температура - 10°С. В данных условиях в течение первых 5-15 дней активность исследуемого фермента снижается на 5-10%, а через месяц установлено сохранение 50% исходной активности АГ (рис. 4).

Таким образом, проведенные исследования позволили установить индукцию АГ в гепатоцитах крыс в условиях пищевой депривации и выделить цитоплазматическую форму фермента. С помощью модифицированного способа очистки был получен в электрофоретически гомогенном состоянии препарат цитоплазматической аконитазы и изучены его физико-химические свойства.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лобкова Н.П // Архив патологии. 1981. № 2. С.72-77.
2. Popov V.N., Igamberdiev A.U., Schnarenberger C., Volvenkin S.V // FEBS Lett. 1996. Vol. 390. P.258-260.
3. Васильева Е.Д. // Усп. Физиол. наук. 1997. Т. 8. №3. С. 97-127.
4. Епринцев А.Т., Землянухин Л.А., Алексюк М.П. // Биохимия. 1995. Т.80. №8. С. 1244-1250.
5. Kennedy M. C., Mende-Muelle L., Blondin G. A. and Beinert H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. Vol. 89. P. 11730 - 11734.
6. Волвенкин С.В., Попов В.Н., Епринцев А. // Биохимия. 1999. Т. 64. Вып.9. С.1185-1191.
7. Popov V.N., Volvenkin S.V., Eprintsev A.T., Igamberdiev A.U. // FEBS J. 1998. Vol. 440. P. 55-58.
8. Гааль Э., Медьеша Г., Верецкин Л. Электрофорез в разделении биологических молекул. М. Мир. 1982. 283 с.
9. Davis B.J. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1964. V. 121. P. 404-427.